

玉米高油型诱导系 CHO11 和 CHO13 的单倍体鉴定效率评价

董昕^{1,2} 田小龙¹ 李伟¹ 刘晨旭¹ 杨华² 官玲³ 李淑君² 张丕辉² 陈绍江^{1*}

(1. 中国农业大学 国家玉米改良中心,北京 100193;

2. 重庆市农业科学院 玉米研究所,重庆 401329;

3. 重庆市农业科学院 农业生物技术研究中心,重庆 401329)

摘要 为系统评价新型高油型诱导系油份鉴定单倍体的效率,以籽粒油分含量分别为 8.71%和 8.72%的 2 个高油型诱导系 CHO11 和 CHO13 为父本,分别在海南省和北京市对 10 个普通玉米杂交种进行诱导,利用油分和 *R1-nj* 遗传标记对诱导产生的籽粒分别进行单倍体的鉴定,并对 2 种鉴定方法进行评价。结果表明:与遗传标记法相比,油分标记法的单倍体鉴定准确率更高,且不易受环境影响。CHO11 和 CHO13 诱导杂交籽粒与其母本单倍体籽粒间的平均油分均值差异分别为 2.21%和 2.02%,变异范围分别为 1.86%~2.63%,1.54%~2.46%;各组合诱导率平均值分别为 8.30%和 8.59%,变异范围分别为 6.25%~10.40%,5.81%~11.19%。诱导系 CHO11 作父本时,以油份均值(μ)+1.645 \times 标准差(σ)作为区分单倍体的阈值,所测组合的单倍体鉴定准确率均高于 90%,漏选率均低于 10%。以 4.0%的籽粒油分含量为通用阈值,所测组合均可达到 90%以上的鉴定准确率。

关键词 玉米; 单倍体; 油分; *R1-nj* 遗传标记; 高油型诱导系

中图分类号 S335.4

文章编号 1007-4333(2019)06-0001-09

文献标志码 A

Evaluation the efficiency of maize haploid identification with High-Oil Inducers CHO11 and CHO13

DONG Xin^{1,2}, TIAN Xiaolong¹, LI Wei¹, LIU Chenxu¹, YANG Hua²,

GUAN Ling³, LI Shujun², ZHANG Pihui², CHEN Shaojiang^{1*}

(1. National Maize Improvement Center of China, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. Maize Research Institute, Chongqing Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 401329, China;

3. Agricultural Biotechnology Research Center, Chongqing Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 401329, China)

Abstract The objective of this study was to systematically evaluate the efficiency of haploid identification by oil content (OC) with new High-Oil Inducers. Ten hybrids were induced by two High-Oil Inducers CHO11 and CHO13 with OC 8.71% and 8.72% respectively in Beijing and Hainan. The haploid identification by OC and *R1-nj* markers were evaluated and compared. The results showed that the accuracy rate (AR) of OC system, which was not influenced by environments, was higher than that of *R1-nj* system. When OC system was used to identify haploids induced by CHO11 and CHO13, the difference in the mean OC of haploids and crossing seeds were respectively 2.21% and 2.02% and the ranges of variation were 1.86% - 2.63% and 1.54% - 2.46%, respectively. The haploid induction rates were 8.30% and 8.59%, with ranges of 6.25%-10.40% and 5.81%-11.19%, respectively. When indexes mean (μ) + 1.645 \times standard deviation (σ) was used as the oil content threshold value to classify the haploids induced by CHO11, the ARs were all beyond 90%. In addition, the missing rates were all below 10%. The ARs of all the crosses were more than 90% by using 4% seed oil as the general threshold.

Keywords maize; haploid; oil content; *R1-nj* marker; High-Oil Inducer

收稿日期: 2018-06-11

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0101201); 国家玉米产业技术体系(CARS-02-04); 重庆市农业科学院青年创新团队项目(Nky-2018QC02); 重庆市基本科研业务(2016cstc-jbky-00506); 重庆市科委项目(cstc2016shms-ztzx80013)

第一作者: 董昕, 助理研究员, 主要从事玉米育种和种质资源研究, E-mail: dongxin53@163.com

通讯作者: 陈绍江, 教授, 主要从事玉米单倍体育种研究, E-mail: chen368@126.com

玉米单倍体育种技术可以快速选育纯系,缩短育种年限,加快育种进程,有助于实现育种的工程化^[1]。近年来,该技术已广泛应用于玉米育种之中并成功选育出优良杂交种^[2-3]。玉米单倍体育种技术主要包括3个关键环节,即单倍体的产生、鉴定和性恢复。随着单倍体育种工程化的大规模应用,对单倍体鉴定效率提出了更高的要求。目前单倍体的鉴定主要依赖于 *A1A2C1C2R1-nj* 标记系统的遗传标记法,即在主效色素基因 *A1* 或 *A2* 以及 *C2* 存在的情况下, *R1-nj* 基因可以使得花青素在胚盾片、籽粒顶端和胚乳糊粉层表达而使其呈现紫色^[4]。当携带 *A1A2C1C2R1-nj* 标记的诱导系作父本与普通材料杂交时,杂交籽粒由于色素基因在胚和胚乳中同时表达,因而籽粒的胚和胚乳糊粉层均显紫色;而单倍体由于是孤雌生殖表现为胚无色而胚乳糊粉层紫色。但是由于部分欧洲硬粒和热带材料含有花青素抑制基因 *C1-I* 位点,无法利用该方法筛选单倍体,因而限制了单倍体育种技术的广泛应用^[5-6]。

除了 *R1-nj* 遗传标记,油分标记也可作为一种有效的单倍体鉴定标记。陈绍江等^[7]首次提出基于油分花粉直感效应鉴定玉米单倍体的方法。当用高油型诱导系与被诱导材料杂交时,由于父本的花粉直感效应使得杂交籽粒的油分显著提高,而单倍体是孤雌生殖,其油分含量和被诱导的母本材料类似,显著低于杂交籽粒,这样通过油分差异就可以将单倍体从杂交籽粒中筛选出来。Melchinger 等^[8]进一步验证了该方法,建立了油分鉴定单倍体的模型,分

析了准确率的影响因素。中国农业大学联合上海纽迈公司开发了基于核磁共振技术的自动化筛选仪器实现了单倍体的快速鉴别,准确率可达90%以上,实现了单倍体鉴定从人工鉴定到机械筛选的转变,大大提高了单倍体的鉴定效率^[9]。为进一步提高该技术的规模化应用效率,选育易于与该装备相匹配的高油型诱导系,中国农业大学基于自主开发的诱导基因分子标记辅助选择技术成功育成新的高油型诱导系^[10]。

利用高油型诱导系进行油份鉴定单倍体方面的研究鲜有报道,因此,本研究基于2个高油型诱导系诱导10个遗传背景不同的杂交组合产生的籽粒,利用油份和遗传标记法对单倍体鉴定准确率和效率进行分析,旨在系统评价新型高油型诱导系的诱导性能及油份鉴定单倍体的效率,比较油分标记和 *R1-nj* 标记鉴定单倍体的效果,为高油型诱导系的广泛应用提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

利用2个高油型诱导系 *CHO11* 和 *CHO13*,在海南和北京2个地点诱导10个不同遗传背景的杂交种(表1)。2个高油型诱导系 *CHO11* 和 *CHO13* 由中国农业大学陈绍江课题组选育,其油分含量分别为8.71%和8.72%(质量分数),以郑单958作为测验种,其诱导率分别为8.12%和7.58%。与诱导系 *CHO11* 相比, *CHO13* 的雄穗更发达,花粉量更大,综合农艺较优。

表1 不同杂交组合的油分含量和遗传背景

Table 1 Oil content and genetic backgrounds of different hybrids

| 杂交组合 Hybrids | 油分质量分数/% Mass percent of oil content | 遗传背景 Genetic background |
|-----------------|---|----------------------------|
| 昌7-2×吉853 | 3.57±0.49 | 唐四平头×唐四平头 |
| 鲁9801×K12 | 2.94±0.45 | 唐四平头×唐四平头 |
| B73×郑58 | 3.31±0.48 | 瑞德×瑞德 |
| 郑58×8112 | 3.61±0.47 | 瑞德×瑞德 |
| 沈137×豫87-1 | 3.68±0.41 | PB群×PB群 |
| 沈137×丹3130 | 3.61±0.47 | PB群×PB群 |
| 许178×P138 | 3.65±0.51 | PB群×PB群 |
| 龙抗11×Mo17 | 3.48±0.49 | 兰卡斯特×兰卡斯特 |
| 丹340×E28 | 4.02±0.42 | 旅大红骨×旅大红骨 |
| 丹340×郑22 | 4.11±0.44 | 旅大红骨×旅大红骨 |

1.2 田间试验设计

2013 年在北京上庄和海南南滨试验站, 利用高油型诱导系 CHOI1 和 CHOI3 分别对 10 个遗传背景不同的杂交组合进行单倍体诱导, 每个组合至少诱导 10 个果穗。果穗收获后, 分别通过 $R1-nj$ 遗传标记和油分标记挑选单倍体, 于 2014 年夏将挑选出的拟单倍体全部于种植于北京市上庄试验站进行田间鉴定, 同时从诱导的每个组合中随机选取 100 粒杂交籽粒种植于田间, 用于矫正二倍体的鉴定结果。

1.3 单倍体鉴定

单倍体鉴定利用了 3 种方法: $R1-nj$ 遗传标记法、油分标记法和田间鉴定法。遗传标记法是基于 $A1A2C1C2R1-nj$ 标记系统, 在杂交籽粒中, 单倍体表现为胚乳紫色而胚无色, 而杂交籽粒的胚乳与胚均表现为紫色, 其鉴定准确率 = (真实单倍体数/遗传标记鉴定单倍体数) $\times 100\%$ 。油分标记法如下: 利用布鲁克公司生产的核磁共振仪 mq20 对全部诱导后的籽粒进行油分测量, 以被诱导材料的籽粒油分均值 (μ) 和标准差 (σ) 来描述单倍体油分分布, 假定单倍体油分分布为正态分布, 以正态分布 90%、95% 和 99% 置信区间对应的值 $\mu + 1.645\sigma$ 、 $\mu +$

1.96σ 和 $\mu + 2.576\sigma$ 这 3 个指标来作为油份阈值区分单倍体和杂交籽粒, 将籽粒含油量小于油分阈值而大于 1.9% 的籽粒认为是拟单倍体 (通常油分含量低于 1.9% 为胚败育或胚部异常籽粒)。田间鉴定法是将油分标记和遗传标记鉴定产生后的拟单倍体种植于田间, 通过单倍体的田间表现来最终确定: 与二倍体材料相比, 单倍体植株矮小, 叶片较窄且上冲。

1.4 油分鉴定单倍体的准确率和漏选率

对于每个杂交组合产生的全部籽粒, 选取油分含量小于 $\mu + 3\sigma$ 认为拟单倍体, 分别按照油分梯度种植于田间, 田间鉴定为单倍体的籽粒将被认为是真实单倍体籽粒, 同时从每个杂交果穗的杂交籽粒中随机选取 100 粒种植于田间作为对照, 将真实总杂交籽粒数简写为 N_D , 真实单倍体籽粒数简写为 N_H , 高于油分阈值而漏选的真单倍体籽粒数简写为 N_{HH} , 低于油分阈值的真单倍体籽粒数简写为 N_{LH} , 低于油分阈值的杂交籽粒数简写为 N_{LD} , 油分鉴定单倍体的准确率 (Accuracy Rate) 简写为 AR, 漏选率 (Missing Rate) 简写为 MR, 因此 $AR = N_{LH} / (N_{LH} + N_{LD}) \times 100\%$, $MR = N_{HH} / N_H \times 100\%$ (表 2)。

表 2 单倍体和杂交籽粒类型

Table 2 Kernel types of haploids and crossing seeds

| 不同倍性籽粒数目 Number of seeds with different ploidy | 低于油分阈值籽粒数目 Number of seeds below oil threshold | 高于油分阈值籽粒数目 Number of seeds beyond oil threshold |
|---|---|--|
| 真实单倍体数 N_H | N_{LH} | N_{HH} |
| 杂交二倍体籽粒数 N_D | N_{LD} | N_{HD} |

2 结果与分析

2.1 油分标记鉴定单倍体的遗传稳定性分析

对诱导系 CHOI1 和 CHOI3 在北京和海南两点诱导的 10 个杂交组合所产生的单倍体和杂交籽粒含油量进行了三因素方差分析。方差分析结果表明, 被诱导材料之间的单倍体籽粒油分差异显著 ($P < 0.01$), 被诱导材料与环境之间、诱导系与环境之间互作对单倍体籽粒油分含量影响不显著, 不同诱导系之间、不同被诱导母本材料之间产生的杂交籽粒的油分含量差异显著 ($P < 0.01$), 不同环境之间产生的杂交籽粒的油分含量差异不显著 (表 3, 表 4)。这表明单倍体籽粒的油分主要由被诱导材料决定, 而与父本诱导系和环境之间没有显著关系;

杂交籽粒油分含量主要取决于诱导系和被诱导材料, 受环境影响较小。

2.2 利用油分鉴定单倍体

由于方差分析结果表明地点对单倍体和杂交籽粒油分影响不存在显著差异, 因此对各个组合诱导产生的 2 个地点的单倍体和杂交籽粒油分数据进行了整合。本研究对整合后的 20 个组合的单倍体和杂交籽粒油分含量进行了分析, 结果表明各组合中杂交籽粒油分含量极显著 ($P < 0.001$) 高于单倍体籽粒油分含量, 两个诱导系诱导后产生的单倍体籽粒油分含量不存在显著差异 ($P > 0.05$), 与诱导系 CHOI3 相比, 除了组合沈 137 \times 丹 3130 和丹 340 \times E28, CHOI1 诱导后的杂交籽粒油分含量显著提高 ($P < 0.05$) (表 5)。CHOI1 诱导的 10 个组合中, 杂

表3 单倍体籽粒油分的方差分析

Table 3 Variation analysis of oil content for haploid

| 方差来源 Sources | 自由度 DF | 平方和 SS | 均方 Mean square | F 值 F value | 显著性 Pr>F |
|-----------------|-----------|-----------|-------------------|----------------|-------------|
| 材料 | 9 | 45.681 57 | 5.075 730 | 135.27 | <0.000 1 |
| 诱导系 | 1 | 0.095 17 | 0.095 172 | 2.54 | 0.112 1 |
| 环境 | 1 | 0.143 26 | 0.143 262 | 3.82 | 0.051 5 |
| 材料×诱导系 | 9 | 1.454 11 | 0.161 568 | 4.31 | <0.000 1 |
| 材料×环境 | 9 | 0.456 88 | 0.050 764 | 1.35 | 0.208 3 |
| 诱导系×环境 | 1 | 0.000 380 | 0.000 380 | 0.01 | 0.919 9 |
| 材料×诱导系×环境 | 9 | 1.281 76 | 0.142 418 | 3.80 | 0.000 1 |

表4 二倍体杂交籽粒油分方差分析

Table 4 Variation analysis of oil content for diploid crossing seeds

| 方差来源 Sources | 自由度 DF | 平方和 SS | 均方 Mean square | F 值 F value | 显著性 Pr>F |
|-----------------|-----------|------------|-------------------|----------------|-------------|
| 材料 | 9 | 78.166 390 | 8.685 155 | 149.97 | <0.000 1 |
| 诱导系 | 1 | 10.246 400 | 10.246 400 | 176.92 | <0.000 1 |
| 环境 | 1 | 0.094 864 | 0.094 864 | 1.64 | 0.201 4 |
| 材料×诱导系 | 9 | 4.828 044 | 0.536 449 | 9.26 | <0.000 1 |
| 材料×环境 | 9 | 2.009 411 | 0.223 268 | 3.86 | 0.000 1 |
| 诱导系×环境 | 1 | 0.142 884 | 0.142 884 | 2.47 | 0.117 1 |
| 材料×诱导系×环境 | 9 | 0.990 341 | 0.110 038 | 1.90 | 0.050 8 |

交籽粒与单倍体籽粒油分均值差异的平均值为 2.21%，变异范围为 1.86%~2.63%，诱导率平均值为 8.30%，变异范围为 6.25%~10.40%；而 CHOI3 诱导的 10 个组合中，杂交籽粒与单倍体籽粒油分均值差异的平均值为 2.02%，变异范围为 1.54%~2.46%，诱导率平均值为 8.59%，变异范围为 5.81%~11.19%，这些均表明诱导系 CHOI1 的花粉直感效应强于 CHOI3 的花粉直感效应，诱导率低于 CHOI3 的诱导率(表 5)。

利用 Shapiro-Wilk 检验对 2 个诱导系诱导 10 个组合产生的单倍体籽粒油分数据进行正态性测验，结果表明在 20 个测试组合中，有 16 个组合的单倍体油分符合正态分布。为了方便且有效地利用油分含量对单倍体进行鉴定，利用正态分布 90%、95%、99% 置信区间对应的值 $\mu + 1.645\sigma$ 、 $\mu + 1.960\sigma$ 和 $\mu + 2.576\sigma$ 这 3 个指标来作为阈值来划

分单倍体和二倍体籽粒，以油分含量经验值 1.9% 区分单倍体和胚败育籽粒。通过对 2 个高油型诱导系诱导的 20 个杂交组合的单倍体鉴定准确率进行分析，发现不论选择哪个阈值，诱导系 CHOI1 的鉴定准确率均高于诱导系 CHOI3 的准确率(表 6)。

油分阈值的选择也影响单倍体鉴定的准确率。当阈值为 $\mu + 1.645\sigma$ ($1.9\% < \text{单倍体油分} < \mu + 1.645\sigma$)，CHOI1 作父本时，单倍体鉴定准确率高于 90%，漏选率低于 10%，CHOI3 作父本时，单倍体鉴定准确率高于 80%，漏选率低于 10%；当阈值为 $\mu + 1.960\sigma$ ($1.9\% < \text{单倍体油分} < \mu + 1.960\sigma$)，CHOI1 作父本时，单倍体鉴定准确率高于 90%，漏选率低于 5%，CHOI3 作父本时，单倍体鉴定准确率高于 74%，漏选率低于 5%；当阈值为 $\mu + 2.576\sigma$ ($1.90\% < \text{单倍体油分} < \mu + 2.576\sigma$)，CHOI1 作父

本时,单倍体鉴定准确率高于 74%,漏选率低于 1%,CHOI3 作父本时,单倍体鉴定准确率高于 57%,漏选率低于 2%(表 6)。随着油分阈值的提高,单倍体鉴定的准确率和漏选率均降低,且准确率降低的幅度大于漏选率降低的幅度(表 6)。以 $\mu + 1.645\sigma$ 作为单倍体鉴定的阈值时,可以保证各个组合漏选率低于 10%的情况下,准确率可以达到 80%

以上(表 6)。为了使高油型诱导系鉴定单倍体更易于操作和广泛应用,分别以油分含量 4.0%和 4.2%作为通用阈值来对所有材料进行测试。油分阈值为 4.0%时,CHOI1 和 CHOI3 诱导后的各组合单倍体鉴定准确率分别高于 98%和 90%;油分阈值为 4.2%时,CHOI1 和 CHOI3 诱导后的各组合单倍体鉴定准确率分别高于 93%和 75%(表 7)。

表 5 不同玉米杂交组合被诱导后单倍体和杂交籽粒油分含量比较

Table 5 Comparison oil content (OC) of haploid (H) and diploid crossing (C) seeds in different crosses induced by two high oil inducers

| 父本 Male parent | 母本 Female parent | 单倍体油 | 单倍体 | 杂交籽粒油 | 杂交籽粒 | 杂交籽粒油分均值- | 诱导率 Haploid induction rate |
|----------------------|---------------------|--|--------------------------------------|--|--------------------------------------|--|-------------------------------------|
| | | 分均值± 标准差 ^b Mean of H OC±SD | 油分分布 范围 Range of C seeds OC | 分均值± 标准差 ^c Mean of C seeds OC±SD | 油分分布 范围 Range of C seeds OC | 单倍体油分均值 ^a Difference in the mean OC of H and C seeds | |
| CHOI1 | 昌 7-2×吉 853 | 3.51±0.52 | 2.02~4.53 | 5.61±0.52* | 4.05~7.37 | 2.10*** | 6.25 |
| | 鲁 9801×K12 | 2.91±0.45 | 2.01~4.03 | 5.12±0.51* | 3.95~6.87 | 2.21*** | 7.67 |
| | B73×郑 58 | 3.44±0.36 | 2.43~4.10 | 5.47±0.59* | 3.96~7.63 | 2.03*** | 7.71 |
| | 郑 58×8112 | 3.75±0.54 | 2.32~4.89 | 5.86±0.64* | 4.26~8.04 | 2.10*** | 9.04 |
| | 沈 137×豫 87-1 | 4.00±0.41 | 2.79~4.96 | 5.87±0.56* | 4.27~7.64 | 1.86*** | 8.68 |
| | 沈 137×丹 3130 | 3.70±0.41 | 2.49~4.66 | 5.72±0.51 | 4.24~7.31 | 2.02*** | 8.11 |
| | 许 178×P138 | 3.70±0.35 | 2.45~4.55 | 6.33±0.49* | 4.58~7.89 | 2.63*** | 10.40 |
| | 龙抗 11×Mo17 | 3.52±0.46 | 2.15~4.55 | 5.62±0.44* | 4.43~7.06 | 2.10*** | 9.06 |
| | 丹 340×E28 | 4.08±0.53 | 2.13~5.19 | 6.53±0.79 | 4.42~8.75 | 2.45*** | 7.80 |
| 丹 340×郑 22 | 4.08±0.49 | 2.62~5.17 | 6.64±0.67* | 4.81~8.77 | 2.56*** | 8.32 | |
| CHOI3 | 昌 7-2×吉 853 | 3.34±0.51 | 1.94~4.68 | 5.30±0.50 | 3.75~6.56 | 1.96*** | 5.81 |
| | 鲁 9801×K12 | 3.01±0.49 | 1.94~4.21 | 4.92±0.51 | 3.62~6.69 | 1.91*** | 8.67 |
| | B73×郑 58 | 3.37±0.41 | 2.28~4.15 | 5.41±0.58 | 4.08~7.51 | 2.04*** | 7.55 |
| | 郑 58×8112 | 3.72±0.52 | 1.96~4.85 | 5.61±0.56 | 4.08~7.41 | 1.89*** | 8.51 |
| | 沈 137×豫 87-1 | 3.81±0.31 | 2.57~4.83 | 5.35±0.47 | 3.92~6.78 | 1.54*** | 10.18 |
| | 沈 137×丹 3130 | 3.81±0.31 | 2.57~4.83 | 5.83±0.52 | 4.48~7.50 | 2.02*** | 9.74 |
| | 许 178×P138 | 3.74±0.36 | 2.52~4.58 | 6.20±0.51 | 4.61~7.82 | 2.46*** | 11.19 |
| | 龙抗 11×Mo17 | 3.46±0.43 | 2.17~4.33 | 5.38±0.47 | 3.82~7.00 | 1.92*** | 7.99 |
| | 丹 340×E28 | 4.11±0.43 | 2.37~4.96 | 6.54±0.78 | 4.33~9.07 | 2.44*** | 7.78 |
| 丹 340×郑 22 | 4.13±0.42 | 2.80~4.85 | 6.11±0.73 | 4.43~8.61 | 1.98*** | 8.52 | |

注:a,各个组合杂交籽粒和单倍体油分籽粒含量的显著性测验;b,2个诱导系诱导后单倍体籽粒油分含量的显著性测验;c,2个诱导系诱导后杂交籽粒油分含量的显著性测验;* , ** , *** 分别表示 P 值为 0.05,0.01,0.001 时显著。

Note:a,significant test of oil content in different crosses of hybrid and haploid kernels;b,significant test of oil content of haploid kernels induced by two inducers;c,significant test of oil content of hybrid kernels induced by two inducers; * , ** and *** indicate significant differences at P=0.05,P=0.01,P=0.001, respectively.

表6 玉米不同杂交组合在3个油分阈值下的单倍体鉴定准确率和漏选率

Table 6 Haploid accuracy rate (AR) and missing rate (MR) of different crosses at three oil content threshold %

| 父本 Male parent | 母本 Female parent | 阈值 ($\mu+1.645\sigma$) Threshold | 准确 率 AR | 漏选 率 MR | 阈值 ($\mu+1.960\sigma$) Threshold | 准确 率 AR | 漏选 率 MR | 阈值 ($\mu+2.576$) Threshold | 准确 率 AR | 漏选 率 MR |
|----------------------|---------------------|--|---------------|---------------|--|---------------|---------------|------------------------------------|---------------|---------------|
| CHOI1 | 昌 7-2×吉 853 | 4.38 | 96.75 | 6.05 | 4.53 | 93.21 | 2.33 | 4.83 | 78.82 | 0.00 |
| | 鲁 9801×K12 | 3.68 | 100.00 | 6.99 | 3.82 | 100.00 | 2.57 | 4.10 | 96.79 | 0.00 |
| | B73×郑 58 | 4.10 | 93.65 | 0.00 | 4.25 | 90.01 | 0.00 | 4.55 | 74.69 | 0.00 |
| | 郑 58×8112 | 4.38 | 98.47 | 9.27 | 4.53 | 96.77 | 4.92 | 4.82 | 84.72 | 0.60 |
| | 沈 137×豫 87-1 | 4.35 | 98.37 | 4.35 | 4.48 | 95.84 | 2.77 | 4.74 | 90.89 | 0.00 |
| | 沈 137×丹 3130 | 4.38 | 95.84 | 3.14 | 4.53 | 93.36 | 1.57 | 4.82 | 76.44 | 0.00 |
| | 许 178×P138 | 4.32 | 100.00 | 0.00 | 4.45 | 99.52 | 0.00 | 4.71 | 99.05 | 0.00 |
| | 龙抗 11×Mo17 | 4.29 | 100.00 | 3.81 | 4.44 | 99.40 | 1.43 | 4.74 | 90.87 | 0.00 |
| | 丹 340×E28 | 4.92 | 95.78 | 9.96 | 5.08 | 92.37 | 4.98 | 5.39 | 81.40 | 0.33 |
| | 丹 340×郑 22 | 4.83 | 99.38 | 7.02 | 4.97 | 99.40 | 3.86 | 5.24 | 91.55 | 0.00 |
| CHOI3 | 昌 7-2×吉 853 | 4.38 | 84.11 | 1.96 | 4.53 | 80.47 | 1.47 | 4.83 | 57.07 | 0.49 |
| | 鲁 9801×K12 | 3.68 | 99.36 | 8.48 | 3.82 | 92.50 | 4.95 | 4.10 | 77.65 | 1.79 |
| | B73×郑 58 | 4.10 | 99.21 | 0.85 | 4.25 | 90.70 | 0.00 | 4.55 | 64.44 | 0.00 |
| | 郑 58×8112 | 4.38 | 91.46 | 7.81 | 4.53 | 86.15 | 4.46 | 4.82 | 69.25 | 0.37 |
| | 沈 137×豫 87-1 | 4.35 | 90.42 | 3.55 | 4.48 | 81.80 | 2.03 | 4.74 | 65.49 | 0.00 |
| | 沈 137×丹 3130 | 4.38 | 100.00 | 7.17 | 4.53 | 99.48 | 2.95 | 4.82 | 91.67 | 0.42 |
| | 许 178×P178 | 4.32 | 100.00 | 3.48 | 4.45 | 100.00 | 0.95 | 4.71 | 99.51 | 0.00 |
| | 龙抗 11×Mo17 | 4.29 | 95.99 | 1.24 | 4.44 | 91.88 | 0.00 | 4.74 | 69.37 | 0.00 |
| | 丹 340×E28 | 4.92 | 87.12 | 5.28 | 5.08 | 79.71 | 0.99 | 5.39 | 69.55 | 0.00 |
| | 丹 340×郑 22 | 4.83 | 80.51 | 0.71 | 4.97 | 74.96 | 0.00 | 5.24 | 60.59 | 0.00 |

2.3 油分标记鉴定单倍体和遗传标记鉴定单倍体的比较

对油分标记和遗传标记鉴定单倍体的2种方法进行了比较。油份标记法中,考虑到单倍体鉴定漏选率要较低($<10\%$),油分标记法选择了 $\mu+1.645\sigma$ 作为阈值。结果表明在诱导系CHOI1产生的10个组合中,油分标记鉴定单倍体准确率均高于遗传标记法的准确率,诱导系CHOI3产生的组合中除组合昌7-2×吉853外,其他9个组合中油分标记鉴定单倍体准确率均高于遗传标记法准确率(图1)。因此,对高油型诱导系来说,油分标记鉴定单倍体的准确率高於遗传标记法的准确率,且诱导系CHOI1的鉴定准确率高於CHOI3的准确率。

3 讨论

3.1 单倍体鉴定方法的比较

玉米单倍体的鉴定方法很多,主要包括基于染色体数目的根尖压片法、基于核酸含量的细胞流式仪测定法、SSR和SNP检测法、荧光标记法、遗传标记法、油分标记法和田间鉴定法^[11-14]。要想实现单倍体的快速高效鉴定,就必须在诱导后的籽粒阶段将单倍体和二倍体进行区分,在现有的鉴定方法中,只有遗传和油分标记法可以在该时期鉴定出单倍体。目前,遗传标记法在单倍体育种中广泛使用,具有较高的效率,但是其存在一定的局限性:1)当被诱导材料含有花青素抑制基因*C1-I*、*C2-Idf*和*In1-D*

表 7 不同杂交组合在通用油分阈值下单倍体鉴定准确率和漏选率

Table 7 Haploid accuracy rate (AR) and missing rate (MR) of different crosses at general threshold %

| 父本 Male parent | 母本 Female parent | 阈值 $\mu=4.0\%$ | | 阈值 $\mu=4.2\%$ | |
|----------------------|---------------------|----------------|-----------|----------------|-----------|
| | | 准确率 AR | 漏选率 MR | 准确率 AR | 漏选率 MR |
| CHOI1 | 昌 7-2×吉 853 | 100.00 | 18.60 | 100.00 | 6.98 |
| | 鲁 9801×K12 | 98.91 | 0.00 | 96.11 | 0.00 |
| | B73×郑 58 | 99.03 | 0.00 | 93.18 | 0.00 |
| | 郑 58×8112 | 100.00 | 35.05 | 100.00 | 22.36 |
| | 沈 137×豫 87-1 | 100.00 | 24.51 | 100.00 | 10.28 |
| | 沈 137×丹 3130 | 100.00 | 19.37 | 100.00 | 10.99 |
| | 许 178×P138 | 100.00 | 19.34 | 100.00 | 4.25 |
| | 龙抗 11×Mo17 | 100.00 | 18.57 | 100.00 | 7.14 |
| | 丹 340×E28 | 100.00 | 54.82 | 100.00 | 39.87 |
| 丹 340×郑 22 | 100.00 | 54.04 | 100.00 | 39.30 | |
| CHOI3 | 昌 7-2×吉 853 | 94.92 | 8.33 | 89.24 | 2.45 |
| | 鲁 9801×K12 | 90.34 | 0.45 | 75.89 | 0.89 |
| | B73×郑 58 | 100.00 | 0.71 | 97.10 | 0.00 |
| | 郑 58×8112 | 100.00 | 29.00 | 100.00 | 29.00 |
| | 沈 137×豫 87-1 | 100.00 | 52.79 | 93.37 | 7.11 |
| | 沈 137×丹 3130 | 100.00 | 27.00 | 100.00 | 13.50 |
| | 许 178×P178 | 100.00 | 25.95 | 100.00 | 7.59 |
| | 龙抗 11×Mo17 | 98.59 | 13.04 | 96.34 | 1.86 |
| | 丹 340×E28 | 100.00 | 63.70 | 100.00 | 48.51 |
| 丹 340×郑 22 | 100.00 | 61.79 | 100.00 | 50.00 | |

时,紫色标记在胚和胚乳中都不能表达,不能实现对单倍体的有效鉴定^[6,15]; 2) *R1-nj* 标记还受环境等因素影响,色素表达在部分材料胚乳或者胚的颜色标记显色较弱,本研究中,组合丹 340×E28、丹 340×郑 22、郑 58×8112 由于胚标记显色弱,导致单倍体大量误选,增大了田间种植鉴定的成本; 3) 该方法需要消耗大量的人工,而且人工挑选速度慢、效率低。与遗传标记法相比,油分花粉直感在不同材料背景上均较为稳定,通过阈值的设定即可实现对其选择的准确性。本研究中阈值为 $\mu + 1.645\sigma$ 时,诱导系 CHOI1 单倍体的鉴定准确率 > 90%, CHOI3 单倍体的鉴定准确率 > 80%, 大大高于 *R1-nj* 遗传标记的准确率; 在单倍体油分阈值为 4.0% 时,所有组合均可以达到 90% 以上的准确

率。同时,油分鉴定单倍体可以实现自动化筛选,使鉴定速度得以大大提升,降低了人工成本^[9]。通过多通道的设置与测试方法的改进,有关筛选设备的进一步改良,从而实现更高通量的精准筛选。

3.2 油分标记鉴定单倍体准确率的影响因素

油分标记鉴定单倍体是一种快速高效的单倍体鉴定方法,但是其鉴定准确率会受到诱导系、被诱导材料和油分阈值的影响。本研究中,由于诱导系 CHOI1 具有较强的花粉直感效应,其鉴定准确率高 于诱导系 CHOI3 的准确率,因此可以通过提高诱导系的花粉直感效应来增加单倍体鉴定的准确率。另外,提高诱导系的油分含量可以使被诱导的杂交籽粒油分含量增加,从而达到提高单倍体鉴定准确

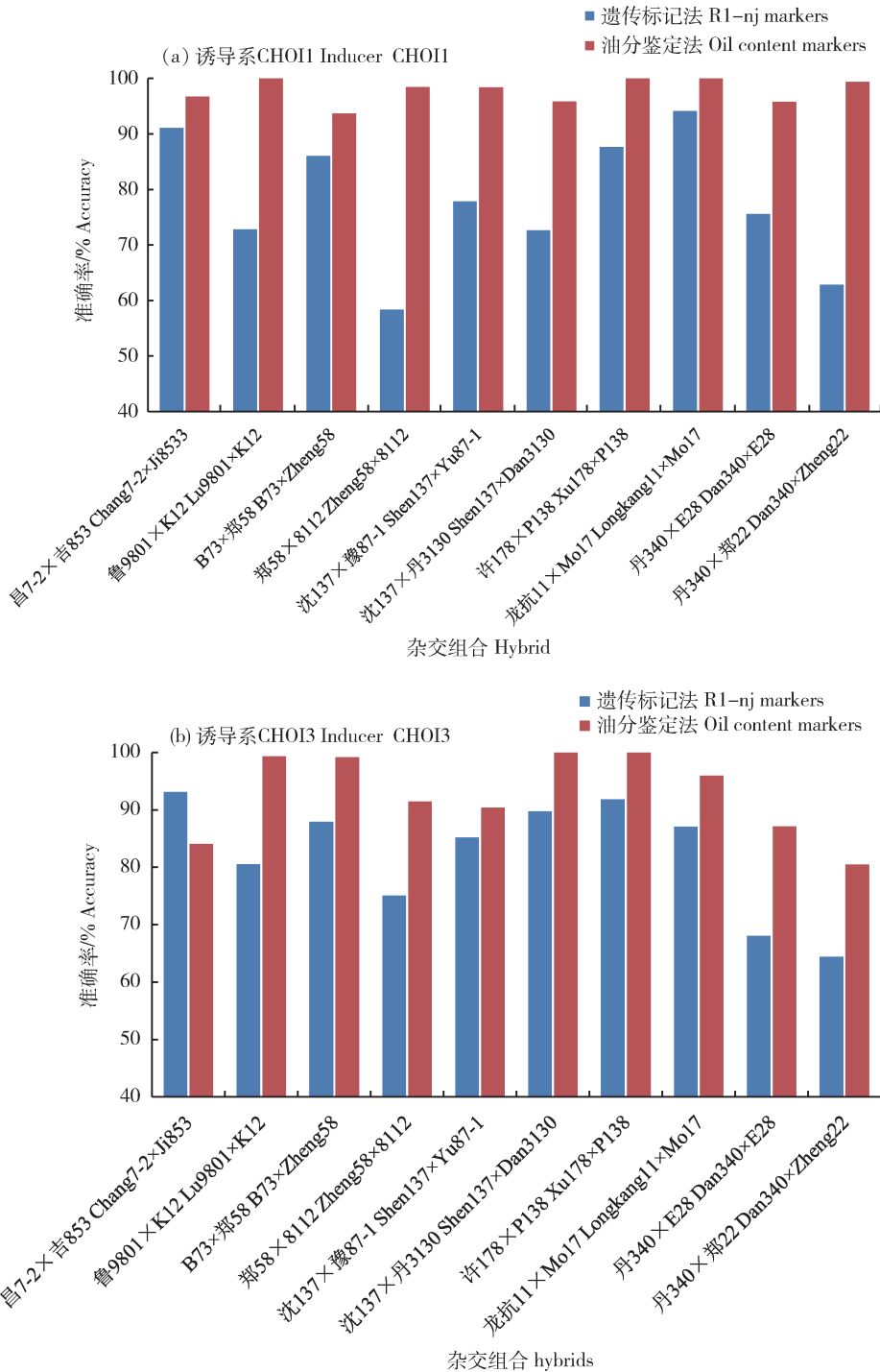


图1 油分标记和遗传标记法对单倍体诱导系 CHO11 (a)和 CHO13 (b)的鉴定准确率比较
Fig. 1 Comparison of haploid accuracy rate by haploid identification based on oil content and R1-nj markers with haploid inducers CHO11 (a) and CHO13 (b)

率的效果^[8,10]。本研究中,诱导材料的遗传背景对单倍体鉴定的准确率也有影响,母本油分越高,被诱导后的杂交籽粒油分的标准差越大,单倍体鉴定的准确率就会越低。当母本为高油材料时,该方法将

不能正常鉴定单倍体。当使用油份含量4.0%作为通用阈值时,单倍体鉴定准确率均高于90%,但是被诱导材料油分含量较高时,会造成较高的漏选率。目前,籽粒油分超过10%的新一代诱导系正在测

试,有望更好地兼顾筛选的准确性和效率,为单倍体育种技术发展提供新的有力支撑。

4 结 论

与遗传标记法相比,油分标记鉴定玉米单倍体的准确率更高。本研究表明当阈值为 $\mu + 1.645\sigma$ 时,2个诱导系单倍体鉴定准确率均高于80%,漏选率低于10%,由于具有更强的花粉直感效应,诱导系CHOI1的鉴定效率高于CHOI3的准确率,且以4.0%的籽粒油分为通用阈值,所有测试组合可以达到90%以上的鉴别准确率。结合自动化的鉴别设备,新一代高油型诱导系的应用有助于实现规模化的单倍体诱导与精准筛选,进一步提升单倍体育种的效率。

参考文献 References

- [1] 陈绍江,黎亮,李浩川.玉米单倍体育种技术[M].北京:中国农业大学出版社,2009
Chen S J, Li L, Li H C. *Maize Doubled-Haploid Technology* [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2009 (in Chinese)
- [2] 王元东,张华生,段民孝,张春原,张雪原,刘新香,陈传永,赵久然.玉米新品种NK₉₇₁的选育及栽培制种技术要点[J].中国种业,2016(2):54-55
Wang Y D, Zhang H S, Duan M X, Zhang C Y, Zhang X Y, Liu X X, Chen C Y, Zhao J R. Breeding and cultivation techniques of new maize variety NK₉₇₁ [J]. *China Seed Industry*, 2016 (2): 54-55 (in Chinese)
- [3] 张亚勤.高产优质大穗型玉米新品种渝单50通过重庆市审定[J].植物医生,2016,31(7)
Zhang Y Q. A new maize variety Yu Dan 50 with high yield, good quality and large ears was approved by Chongqing [J]. *Plant Doctor*, 2016, 31(7) (in Chinese)
- [4] Nanda D K, Chase S S. An embryo marker for detecting monploids of maize (*Zea mays* L) [J]. *Crop Science*, 1966, 6 (2): 213-215
- [5] Prasanna B M, Chaikam V, Mahuku G. *Doubled Haploid Technology in Maize Breeding: Theory and Practice* [M]. Mexico, D. F.: Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo Press, 2012
- [6] Röber F K, Gordillo G A, Geiger H H. *In vivo* haploid induction in maize—performance of new inducers and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding [J]. *Maydica*, 2005, 50(3): 275-283
- [7] 陈绍江,宋同明.利用高油分的花粉直感效应鉴别玉米单倍体[J].作物学报,2003,29(4):587-590
Chen S J, Song T M. Identification haploid with high oil content effect in maize [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2003, 29(4): 587-590 (in Chinese)
- [8] Melchinger A E, Schipprack W, Würschum T, Chen S, Technow F. Rapid and accurate identification of *in vivo*-induced haploid seeds based on oil content in maize [J]. *Scientific Reports*, 2013, 3(3): 2129
- [9] Liu J, Guo T T, Li H C, Jia S Q, Yan Y L, An D, Zhang Y, Chen S J. Discrimination of maize haploid seeds from hybrid seeds using vis spectroscopy and support vector machine method [J]. *Spectroscopy & Spectral Analysis*, 2015, 35(11): 3268-3274
- [10] Dong X, Xu X, Li L, Liu C X, Tian X L, Li W, Chen S J. Marker assisted selection and evaluation of high oil *in vivo* haploid inducers in maize [J]. *Molecular Breeding*, 2014, 34 (3): 1147-1158
- [11] Antoine-Michard S, Beckert M. Spontaneous versus colchicine-induced chromosome doubling in maize anther culture [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1997, 48(3): 203-207
- [12] Barret P, Brinkmann M, Beckert M. A major locus expressed in the male gametophyte with incomplete penetrance is responsible for *in situ* gynogenesis in maize [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2008, 117(4): 581-594
- [13] Li L, Xu X, Jin W, Chen S J. Morphological and molecular evidences for DNA introgression in haploid induction via a high oil inducer CAUHOI in maize [J]. *Planta*, 2009, 230(2): 367-376
- [14] Zhao X, Xu X, Xie H, Chen S, Jin W. Fertilization and uniparental chromosome elimination during crosses with maize haploid inducers [J]. *Plant Physiology*, 2013, 163(2): 721-731
- [15] Belicuas P R, Guimaraes C T, Paiva L V, Duarte J M, Maluf W R, Paiva E. Androgenetic haploids and SSR markers as tools for the development of tropical maize hybrids [J]. *Euphytica*, 2007, 156(1-2): 95-102

责任编辑:吕晓梅